

: 10.3724/SP.J.1118.2011.00089

粪肠球菌累积对虾夷扇贝免疫酶活性的影响

李斌^{1,2,3}, 陈碧鹃³, 齐占会⁴, 方建光³, 廉伟³, 任仲³, 王丽丽³

1. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071;

2. 中国科学院 研究生院, 北京 100049;

3. 农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室, 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071;

4. 中国水产科学研究院 南海水产研究所, 广东 广州 510300

摘要: 定量分析了粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)在虾夷扇贝(*Pactinopecten yessoensis*)中的累积及其组织分布, 以及扇贝血淋巴中 2 种免疫相关酶的活性变化。采用接触染毒法, 将扇贝浸泡于含 10^5 个细菌细胞/mL 的海水中处理 2 周, 采用平板计数法测定了在不同暴露时间和不同扇贝组织中细菌累积数量的变化, 并抽取扇贝血淋巴测定了超氧化物歧化酶(SOD)和酸性磷酸酶(ACP)活性。发现处理第 7 天时, 扇贝中含菌量达到最高, 为 5.20 lg(CFU/g), 第 14 天时又降低到与第 3 天相当的水平。而累积速率(RA)在第 1 天时最高, 此后均逐渐降低。结果表明, 随着在细菌中暴露时间的延长, 扇贝累积的细菌数量增长明显减缓。消化道以及外套膜和鳃中细菌含量最高, 比软组织平均值高 1 个数量级以上; 而在血淋巴中含量极低, 比软组织平均值低 2 个数量级以上。血淋巴中 SOD 和 ACP 酶活性均有先升高后降低的趋势, 第 7 天时 2 种酶活性均达到最大。实验期间, 扇贝血淋巴中免疫酶活性与体内累积的细菌数量变化趋势一致。血清中的可溶性免疫因子对细菌侵染更敏感, 2 种酶活性与扇贝组织中累积的细菌数量具有明显相关性, 但在血细胞中则不明显, 由此推测血清可能是扇贝杀灭和消化入侵细菌的首要场所。[中国水产科学, 2011, 18(1): 89–95]

关键词: 粪肠球菌; 虾夷扇贝; 累积; 组织分布; 超氧化物歧化酶; 酸性磷酸酶

中图分类号: S944

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2011)01-0089-07

近年来, 近海海域生态环境质量的下降致使扇贝防御能力降低, 高水温期易出现养殖扇贝大规模死亡, 这与此阶段微生物大量繁殖^[1-3], 加大了贝类携带致病病原物的几率有关。被滤食的细菌在扇贝各组织的分布差异很大, 且在许多组织内的分布随累积时间而变化。Power 等^[4]发现约有 90% 的大肠杆菌(*Escherichia coli*)主要存在于贻贝(*Mytilus edulis*)的消化道, 而在血淋巴中的还不到 1%。活的坎氏弧菌(*Vibrio campbellii*)在牡蛎(*Crassostrea virginica*)血淋巴中的累积数量随时间而变化^[5]。贝类可以在几个小时内就从环境中累积大量的细菌, 但是累积和排出的速率在不同

宿主或细菌种属间存在差异, 这可能是由于宿主所处的环境不同^[6]和细菌与扇贝免疫系统相互作用^[7]不同造成的。

对栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)注射大肠杆菌^[8]或栉孔扇贝急性病毒性坏死症病毒(AVNV)^[9]均可以促进血细胞中超氧化物歧化酶(SOD)和酸性磷酸酶(ACP)的产生、释放和酶活性的升高。ACP 也可能参与了栉孔扇贝二次感染后的免疫防御过程^[10]。不同贝类组织中的 SOD 酶活性差异较大^[11-12]。粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)属革兰氏阳性菌, 在海洋等环境中比大肠杆菌存活力更强^[13], 现已成为医院感染的重要致病菌^[14]和环境

收稿日期: 2010-03-19; 修订日期: 2010-05-04.

基金项目: 国家 973 计划项目(2006CB400608); 农业部农业公益性行业科研专项(nyhyzx07-047).

作者简介: 李斌(1980-), 博士研究生, 主要从事贝类养殖环境生物学的研究. E-mail: albert0722@163.com

通讯作者: 方建光, 研究员. Tel: 0532-85822957; E-mail: fangjg@ysfri.ac.cn

中的粪便污染指示菌^[15], 具有成为水产贝类食源性病原菌的可能性。目前, 国内外多采用注射法研究双壳贝类免疫系统对微生物感染的响应^[5,7-9], 有关粪肠球菌在贝类体内的消长、组织分布及其与宿主组织中免疫酶相互作用的研究还未见报道。本研究采用接触染毒法研究了粪肠球菌在虾夷扇贝中的累积规律, 并首次探讨了扇贝 2 种重要的免疫酶——SOD和ACP活性的变化与细菌累积数量的关系, 以期探讨环境有害细菌与扇贝免疫系统相互作用机理提供一定的理论基础, 并为降低细菌暴露对养殖扇贝的潜在危害和减少贝源性病原菌的传播提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 虾夷扇贝的采集和暂养 2009 年 4 月, 虾夷扇贝湿重(7.97 ± 0.26) g, 壳长(43.50 ± 0.80) mm, 取自荣城寻山集团养殖海域。4℃条件下在 6 h 内送至实验室。暂养 5 d, 暂养期间, 水温(18.37 ± 1.94)℃, 海水盐度 29.97 ± 0.23 , pH 8.52 ± 0.03 , 溶解氧(5.23 ± 0.31) mg/L。水温通过空调调节室温来维持稳定, 暂养期间不投饵, 每天换水 1 次。

1.1.2 菌种的活化与扩增 粪肠球菌菌株(ATCC29212)购自广东省微生物研究所菌种保藏中心, 在营养琼脂(北京陆桥)上活化 2 次后, 4℃下斜面保存备用。活化后的细菌在营养肉汤培养基中 36℃下培养 24 h, 培养物于 3 000 g 离心 15 min, 所得沉淀用 0.01 mol/L 的磷酸缓冲液(PBS, 0.5 mmol/L Na_2HPO_4 , 1.5 mmol/L KH_2PO_4 , 0.13 mol/L NaCl, pH 7.4)清洗 2 次, 并制得 10^9 /mL 的细胞悬液, 4℃下保存备用。

1.2 粪肠球菌在贝类体内的累积实验

暂养后的扇贝转入试验水箱(聚乙烯, 30 cm×40 cm×40 cm)中, 贝体湿重(W)和水体容积(V)之比保持在 1:100 左右。向试验组加入 1 mL 新鲜的粪肠球菌菌悬液, 使海水中的终浓度为 5 lg(CFU/mL), 对照组中加入 1 mL 0.01 mol/L 的 PBS 缓冲液。每箱投喂贝鲜重的 0.03% 的螺旋藻粉。每箱 30 只扇贝, 每组设 3 个平行。

实验采用半静水法, 每天换水 1 次, 并在换水后接种新鲜的菌悬液, 然后投饵, 持续充气(10 L/min)。实验期间的环境条件与暂养期间一致。

1.3 粪肠球菌在贝类体内的富集及其组织分布测定

样品的采集与处理方法参照《食品卫生微生物学检验 水产食品检验》(GB/T 4789.20-2003)^[16], 粪肠球菌的计数参照《出口食品平板菌落计数》(SN0168-92)^[17] 和《出口商品中粪链球菌群检验方法》(SN/T0475-95)^[18], 并略有修改。简要步骤如下: 分别在第 1 天、3 天、5 天、7 天和 14 天时, 分别取 4 只扇贝, 剖取全部软组织及体液, 混合匀浆后测定细菌含量。用细菌累积速率(RA)来衡量粪肠球菌在扇贝中累积数量与暴露时间的关系, 其计算公式是: $RA = (\text{处理组细菌数量} - \text{对照组细菌数量}) / \text{暴露时间}(d)$ 。

在第 3 天时, 取 6~8 只扇贝, 用灭菌的蒸馏水冲洗干净, 吸去表面的水滴后, 用一次性 1 mL 的注射器(25 号针头)从扇贝的闭壳肌后缘抽取血淋巴, 于 4℃下保存备用。再用镊子和剪刀撬开贝壳并取出消化道、外套膜和鳃、闭壳肌和性腺, 分别匀浆 2 min, 用 0.01 mol/L 的 PBS 缓冲液做系列 1/10 稀释后待测。取 1 mL 适当稀释度的组织悬液加入一次性培养皿中央, 倒入约 15 mL 的肠球菌选择性显色培养基(PSE, 北京陆桥), 混匀后于 36℃下培养 20~24 h, 观察计数, 每个处理设 3 个平行。组织和血淋巴中细菌的数目分别以 lg(CFU/g)和 lg(CFU/mL)表示。

1.4 酶液制备与活性测定

血淋巴的提取以及酶提取液的制备参照孙虎山等^[11]的方法, 简要步骤如下: 在累积实验的第 1 天、7 天和 14 天, 各选取 6 只扇贝, 用 1 mL 的一次性注射器(25 号针头)从扇贝的闭壳肌后缘抽取血淋巴 3 mL; 4℃下 780 g 离心 10 min, 移出上清液, 即为扇贝血清, 冰上暂存备用; 向沉淀的血细胞中加入与血清等量的预冷的双蒸水, 低渗法溶血后在 4℃下 5 390 g 离心 15 min, 移出上清液, 即为扇贝血细胞酶提取液, 冰上暂存备用。于 24 h 内完成酶活力测定。

SOD 和 ACP 活性测定采用南京建成生物工

程研究所的试剂盒进行, 计算结果分别用 U/mL 和 U/100 mL 来表示。SOD 活力单位定义为, 1 mL 反应液中 SOD 抑制率达 50%时所对应的 SOD 量为 1 个 SOD 活力单位(U); ACP 活力单位定义为, 100 mL 血清在 37℃与基质作用 30 min 产生 1 mg 酚为 1 个活力单位(U)。利用 SPSS 10.0 软件的 ANOVA 单因素方差分析和 Duncan's 多重比较进行显著性检验, 差异显著度为 0.05。

2 结果与分析

2.1 粪肠球菌在扇贝体内的累积

实验中扇贝累积粪肠球菌数量随暴露时间的变化如图 1 所示。暴露第 1 天, 扇贝中富集的粪肠球菌即达到 3.46 lg(CFU/g) ($P<0.05$), 随实验时间的延长, 扇贝体内粪肠球菌的数量逐渐增加, 第 3 天数量为 4.77 lg (CFU/g) ($P<0.05$), 至第 7 天扇贝体内粪肠球菌数量达到了最高, 为 5.20 lg (CFU/g) ($P<0.05$); 实验第 14 天, 扇贝体内粪肠球菌数量下降, 接近第 3 天水平。第 1 天、3 天、5 天、7 天和 14 天的累积速率(RA)依次为 3.462 ± 0.021 、 1.590 ± 0.018 、 0.969 ± 0.002 、 0.744 ± 0.001 和 0.343 ± 0.001 。第 1 天时最高, 此后均依次显著降低 ($P<0.05$), 第 3 天时降到 1.59, 而从第 5 天开始, RA 则小于 1, 第 14 天比第 1 天减小了 90%以上。这表明, 随着处理时间的延长, 扇贝累积的细菌数量的增长明显减缓。

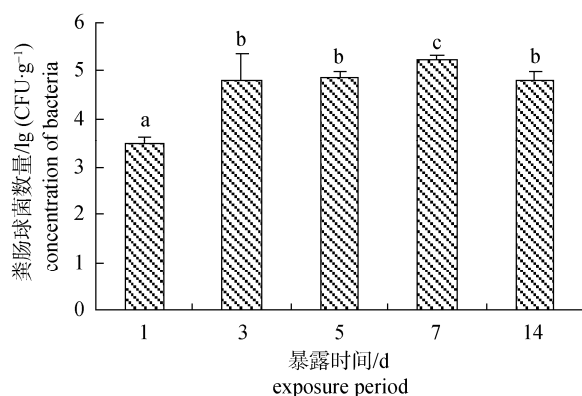


图 1 虾夷扇贝在暴露于 5 lg(CFU/mL)粪肠球菌的海水中体内累积的细菌数量

不同字母表示组间相比差异显著 ($P<0.05$)。

Fig.1 Retention of *Escherichia faecalis* by scallop in seawater inoculum of 5 lgCFU/mL living bacterium cells
Different letters indicate significant difference between groups ($P<0.05$).

2.2 粪肠球菌在扇贝中的组织分布

对照组各组织中, 均未检测到粪肠球菌。粪肠球菌在扇贝中的组织分布如图 2 所示, 按浓度由高到低依次为: 外套膜和鳃 [(6.28±1.12) lg(CFU/g)]、消化道 [(6.23±0.85) lg(CFU/g)]、闭壳肌 [(4.96±0.98)lg(CFU/g)]、性腺 [(4.53±0.34) lg(CFU/g)]、血淋巴 [(2.53±0.91) lg(CFU/g)]。消化道与外套膜和鳃均比全部软组织 [(5.12±1.75) lg(CFU/g)] 的细菌含量高 1 个数量级以上 ($P<0.05$), 而血淋巴中的数量最低, 比全部软组织低 2 个数量级以上, 比消化道、外套膜和鳃低约 4 个数量级 ($P<0.05$)。闭壳肌与全部软组织和性腺之间差别不明显 ($P>0.05$)。可以说扇贝累积的细菌主要集中到消化道、外套膜和鳃中, 而在血淋巴中含量极低。

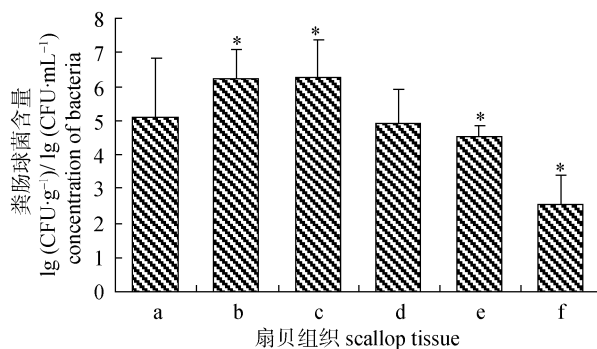


图 2 粪肠球菌在虾夷扇贝各组织中的分布

a: 全部软组织; b: 消化道; c: 外套膜和鳃; d: 闭壳肌; e: 性腺; f: 血淋巴。星号代表与 a 比较差异显著 ($P<0.05$)。

Fig.2 Tissue distribution of *Escherichia faecalis* in scallops
a: total soft tissues; b: digestive tract; c: mantle lobe and gill; d: adductor muscle; e: gonad; f: haemolymph. Asterisks indicate significant differences compared with group a ($P<0.05$).

2.3 长期累积粪肠球菌后扇贝血淋巴中 SOD 和 ACP 活性变化

本实验条件下, 处理组血淋巴中 SOD 酶活性呈先增大后降低的趋势(图 3)。暴露第 7 天, 处理组血细胞中 SOD 酶活性达到最高(44.95 U/mL), 明显高于第 1 天 ($P<0.05$); 第 14 天时, SOD 活性降至 38.62 U/mL, 与对照差异不显著 ($P>0.05$)。第 7 天时, 处理组血清中的 SOD 活性增加到 127.95

U/mL, 第 14 天时降低至 107.99 U/mL, 但仍比第 1 天时要高($P < 0.05$)。整个实验期间, 处理组血清中的 SOD 酶活性均明显高于相应对照组的值($P < 0.05$)。血清中 SOD 酶活性与累积的细菌数量具有一定的相关关系, 但血细胞中则相关性不明显。

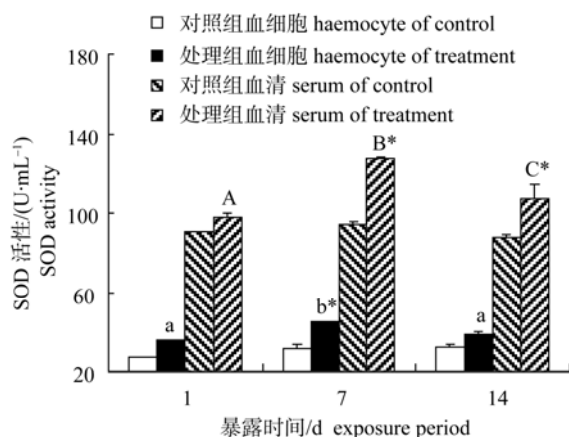


图 3 累积粪肠球菌后的扇贝血淋巴中 SOD 酶活性的变化
上标的字母分别代表与第 1 天比较的差异显著性, 不同字母表示差异显著($P < 0.05$); 星号表示与相应对照组差异显著($P < 0.05$)。

Fig. 3 Variations of SOD activities in hemolymph of scallop after uptake of *Escherichia faecalis*
Superscript letters indicate significance of difference compared with the value at day 1 and different letters indicate significant difference ($P < 0.05$). Asterisks indicate significant difference compared with control ($P < 0.05$).

本实验条件下, 暴露处理使血淋巴中 ACP 酶活性呈先增大后降低趋势(图 4)。整个实验期间, 处理组血细胞中的酶活性均高于对照组, 但二者之间差异不显著($P > 0.05$), 而血清中 ACP 酶活性则有明显差异($P < 0.05$)。处理组血细胞中 ACP 酶活性呈先增大后降低趋势, 在第 7 天达到最高值 1.35 U/100mL, 但随处理时间变化不明显($P > 0.05$)。血清中的 ACP 活性也表现出先增大后降低的变化趋势, 第 7 天达到最高值。第 1 天时, 处理组血清中的 ACP 活性高于对照, 但差异不显著($P > 0.05$); 第 7 和 14 天时, 处理组酶活性均比第 1 天时显著升高, 且处理组均明显高于对照($P < 0.05$)。血清中 ACP 酶活性与累积的细菌数量具有一定的相关关系, 但血细胞中则表现不明显。

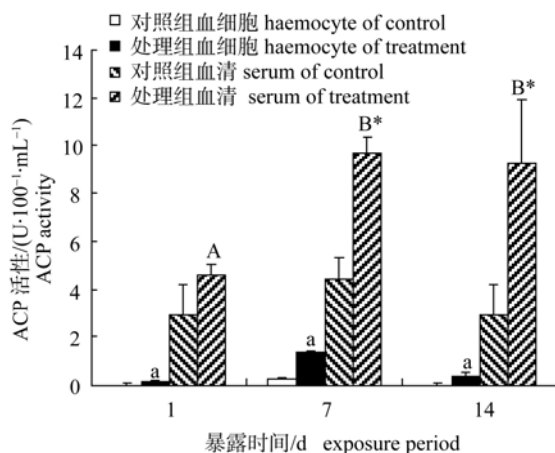


图 4 累积粪肠球菌后的扇贝血淋巴中 ACP 酶活性的变化
上标的字母分别代表与第 1 天比较的差异显著性, 不同字母表示差异显著($P < 0.05$); 星号代表与相应对照组差异显著($P < 0.05$)。

Fig. 4 Variations of ACP activities in hemolymph of scallop after uptake of *Escherichia faecalis*
Superscript letters indicate significance of difference compared with the value at day 1 and different letters indicate significant difference ($P < 0.05$). Asterisks indicate significant difference compared with control ($P < 0.05$).

3 讨论

研究表明, 肠球菌属的坚韧肠球菌(*Enterococcus durans*)在贻贝(*Mytilus galloprovincialis*)中比大肠杆菌和霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)累积得更快^[19]。本研究也发现, 同为肠球菌属的粪肠球菌也能在虾夷扇贝中很快地大量累积。推测肠球菌属细菌可能比大肠杆菌更易于在贝类消化道定植和生长。徐捷等^[20]发现, 循环水系统中暴露 4 h 后, 大肠杆菌在菲律宾蛤(*Ruditapes philippinarum*)中的富集达到平衡, 且在 48 h 内保持基本稳定。而本研究结果显示, 处理第 1 天, 粪肠球菌在扇贝中的累积速率最高, 此后均明显减小($P < 0.05$), 扇贝累积的细菌数量增长明显减慢(表 1)。第 3 天时, 粪肠球菌在扇贝体内可以达到较高值, 第 14 天时与之相比无明显变化($P > 0.05$)(图 1)。上述结果均表明, 随着暴露时间的延长, 最终细菌可能会达到一个较稳定的累积量, 可称之为扇贝对该细菌的“最大容纳量”。而本研究与徐捷等^[20]的结果也有一些不同, 即细菌累积达到稳定状态所需的时间和累积速率等, 这可能是由接种细菌的

菌株、初始接种浓度以及实验贝类品种不同造成的。

粪肠球菌的组织分布特点,与贝类组织的结构特性和生理功能有关^[4]。扇贝属于滤食性软体动物,外套膜和鳃具有选择性滤过功能,进入消化道的颗粒经消化吸收后进入体液或排出体外。扇贝还具有一个开放的循环系统,当环境细菌侵入或被滤食后部分进入血淋巴,血细胞与血淋巴中的可溶性因子协同作用抵御外来微生物的侵入^[21]。所以,消化道、外套膜和鳃便成了环境细菌聚集的主要组织,而通过血淋巴可将部分细菌转送至各个组织。将活的坎氏弧菌注射到牡蛎(*Crassostrea virginica*)体内后,只有血淋巴中累积的活菌数随时间而发生变化,并且细菌存活力随时间逐渐降低^[5],其他组织中变化不明显。本研究也发现,暴露处理 14 d 时,扇贝全部软组织中粪肠球菌数量与第 3 天、5 天时相比变化不明显($P>0.05$)。可能是由于微生态环境及其对细菌的杀伤力等有所差异,造成各组织累积的细菌数目差异较大。有证据表明,细菌在贝类组织内的持有量很大程度上随该细菌对血淋巴杀菌活性的敏感度、细菌细胞表面的结构特征和环境条件如温度等而定^[19]。

贝类血淋巴中的可溶性因子、血细胞的信号通路及其细菌细胞的表面结构共同决定了弧菌—血淋巴相互作用的结果^[22]。本实验结果表明,粪肠球菌的累积量与血淋巴中 SOD 和 ACP 酶活性均呈先增大后降低的趋势,第 7 天达到最高(图 3、图 4)。血清中 SOD 和 ACP 酶活性与累积的细菌数量变化具有明显相关性,但血细胞中则变化不明显,这与 Xing 等^[9]的结果相似。实验过程中对照组酶活性出现波动,原因可能是扇贝长时间在小水体中养殖,并且饵料单一等造成的。感染弧菌后,菲律宾蛤血细胞免疫活性减弱^[23]。本研究发现,虾夷扇贝的免疫酶活力在粪肠球菌暴露的第 1 周内虽有增强,但是第 14 天时,血细胞中的 SOD 活性比第 7 天时明显降低($P<0.05$),当长期暴露于污染有大量卫生细菌的海水环境中时,血细胞免疫活性最终可能会降低,这样会增加感染疾病和大量幼体死亡的风险^[24]。Xing 等^[25]研究发现,在

栉孔扇贝不同类型血细胞中的多种免疫酶活性均有所差异;Li 等^[26]研究发现,贻贝在注射弧菌 2~3 d 后明显增强了溶酶体酶基因的表达。经短期接触染毒处理的虾夷扇贝血细胞中的 SOD 和 ACP 酶活性及其基因表达等是否也具有上述特点,以及长期暴露于高浓度的卫生细菌对扇贝免疫系统的影响等有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] 宋微波,王崇明,王秀华,等. 栉孔扇贝大规模死亡的病原研究新进展[J]. 海洋科学, 2001, 25(12): 23–26.
- [2] 蒋增杰,方建光,门强,等. 桑沟湾贝类筏式养殖与环境相互作用研究[J]. 南方水产, 2006, 2(1): 23–29.
- [3] 宋庆云,罗挽涛,王文兴,等. 扇贝的养殖环境及其体内的细菌学分析[J]. 黄渤海海洋, 1997, 15(3): 26–30.
- [4] Power U F, Collins J K. Tissue distribution of a coliphage and *Escherichia coli* in mussels after contamination and depuration[J]. Appl Environ Microbiol, 1990, 56(3): 803–807.
- [5] Williams H R, Macey B M, Burnett L E, et al. Differential localization and bacteriostasis of *Vibrio campbellii* among tissues of the eastern oyster, *Crassostrea virginica*[J]. Dev Comp Immunol, 2009, 33(4): 592–600.
- [6] Motes M L, DePaola A, Cook D W, et al. Influence of water temperature and salinity on *Vibrio vulnificus* in Northern Gulf and Atlantic Coast oysters (*Crassostrea virginica*)[J]. Appl Environ Microbiol, 1998, 64(4): 1459–1465.
- [7] Hong X T, Xiang L X, Shao J Z. The immunostimulating effect of bacterial genomic DNA on the innate immune responses of bivalve mussel, *Hyriopsis cumingii* Lea[J]. Fish Shellfish Immunol, 2006, 21: 357–364.
- [8] 孙虎山,李光友. 大肠杆菌感染后栉孔扇贝血淋巴中 7 种酶活力的变化[J]. 海洋科学, 1999(5): 40–44.
- [9] Xing J, Lin T T, Zhan W B. Variations of enzyme activities in the haemocytes of scallop *Chlamys farreri* after infection with the acute virus necrobiosis virus (AVNV) [J]. Fish Shellfish Immunol, 2008, 25(6): 847–852.
- [10] Cong M, Song L S, Wang L L, et al. The enhanced immune protection of Zhikong scallop *Chlamys farreri* on the secondary encounter with *Listonella anguillarum*[J]. Comp Biochem Physiol: Biochem Mol Biol, 2008, 151(2)B: 191–196.
- [11] 孙虎山,李光友. 栉孔扇贝血淋巴中超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性及其性质的研究[J]. 海洋与湖沼, 2000, 31(3): 259–265.
- [12] 牟海津,江晓路,刘树青,等. 免疫多糖对栉孔扇贝酸性

- 磷酸酶、碱性磷酸酶和超氧化物歧化酶活性的影响[J]. 青岛海洋大学学报, 1999, 29(3): 463–468.
- [13] Hartke A, Lemarinier S, Pichereau V, et al. Survival of *Enterococcus faecalis* in seawater microcosms is limited in the presence of bacterivorous zooflagellates[J]. Curr Microbiol, 2002, 44: 329–335.
- [14] 李金钟. 肠球菌分类与鉴定新进展[J]. 临床检验杂志, 2006, 24(3): 228–230.
- [15] Tallon P, Magajna B, Lofranco C, et al. Microbial indicators of faecal contamination in water: a current perspective[J]. Water Air Soil Poll, 2005, 166: 139–166.
- [16] 中华人民共和国卫生部, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 4789.20-2003 食品卫生微生物学检验 水产食品检验[S]. 北京: 中国标准出版社, 2003.
- [17] 中华人民共和国国家进出口商品检验局. SN0168-92 出口食品平板菌落计数[S]. 北京: 中国标准出版社, 1992.
- [18] 中华人民共和国国家进出口商品检验局. SN/T0475-95 出口商品中粪链球菌群检验方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 1995.
- [19] Marino A, Lombardo L, Fiorentino C, et al. Uptake of *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* non-O1 and *Enterococcus durans* by, and depuration of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) [J]. Int J Food Microbiol, 2005, 99(3): 281–286.
- [20] 徐捷, 乔庆林, 蔡友琼, 等. 菲律宾蛤仔养殖水体中大肠杆菌安全限量的研究[J]. 水产科技情报, 2006, 33(1): 3–7.
- [21] Muller W E G, Rinkevich B. Invertebrate immunology[J]. Prog Mol Subcell Biol, 1996, 15: 247.
- [22] Pruzzo C, Gallo G, Canesi L. Persistence of vibrios in marine bivalves: the role of interactions with haemolymph components[J]. Environ Microbiol, 2005, 7(6): 761–772.
- [23] Choquet G, Soudant P, Lambert C, et al. Reduction of adhesion properties of *Ruditapes philippinarum* hemocytes exposed to *Vibrio tapetis*[J]. Dis Aquat Organ, 2003, 57(1-2): 109–116.
- [24] Malham S K, Lacoste A, Gélébart F, et al. Evidence for a direct link between stress and immunity in the Mollusc *Haliotis tuberculata*[J]. J Exp Zool: Ecol Genet Physiol, 2003, 295A: 136–144.
- [25] Xing J, Zhan W B, Zhou L. Endoenzymes associated with haemocyte types in the scallop (*Chlamys farreri*)[J]. Fish Shellfish Immunol, 2002, 3(4): 271–278.
- [26] Li H, Parisi M G, Toubiana M, et al. Lysozyme gene expression and hemocyte behaviour in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*, after injection of various bacteria or temperature stresses[J]. Fish Shellfish Immunol, 2008, 25(1-2): 143–152.

Accumulation of *Enterococcus faecalis* and variation of SOD and ACP activities in scallop *Pactinopecten yessoensis* tissues

LI Bin^{1,2,3}, CHEN Bijuan³, QI Zhanhui⁴, FANG Jianguang³, LIAN Wei³, REN Zhong³, WANG Lili³

1. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China;

2. Graduate University, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

3. Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources, Ministry of Agriculture; Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

4. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China

Abstract: *Enterococcus faecalis* is a common bacterium found in aquatic environment and intestines of warm-blooded animals and human. In summer, it can reach high level in sewage-polluted seawater and be accumulated by scallops. Large numbers of bacteria may constitute significant health risk to cultured animals at high temperature or in other specific conditions. However, the retention of *E. faecalis* in scallop remains unclear, and information about hosts' growth performance, innate immunity and disease outbreak after a long-term exposure to non-pathogenic fecal bacteria is limited. The present study aims to investigate the relationship between retention of an opportunistic bacterium and variation in immune enzyme activity in the scallop, *Pactinopecten yessoensis*. The findings of this study will be useful for developing aquaculture probiotics and will provide scientific basis for

sustainable aquaculture of bivalves.

By bath exposure, the accumulation and distribution of *E. faecalis* in scallop tissues were analyzed, and the variation in activities of two immunity-related enzymes in haemolymph were also detected. After exposure to seawater inoculum of 5 lg (CFU/mL) *E. faecalis* for two weeks, the uptake of bacteria at day 1, 3, 5, 7 and 14 and their distribution in scallop tissues were detected by plate counting method respectively. The activity of acid phosphatase (ACP) and superoxide dismutase (SOD) were also determined both in haemocytes and in serum of *P. yessoensis*. The uptake results showed that at 7 d top level of *E. faecalis*[5.20 lg(CFU/g)] were tested in scallop tissues, but at 14 d it decreased to the level of 3 d after treatment. However, the rate of bacterial accumulation (RA) was the highest at 1 d, and then significantly decreased ($P<0.05$). It indicated that the bacterial accumulation rate in scallops decreased with exposure time. The top level of *E. faecalis*, over ten times higher than the average density of total tissues, was observed in digestive tract, mantle lobes and gills, but the lowest was detected in haemolymph, over 100 times lower than the average. SOD and ACP activities in cell-free haemolymph significantly increased to the maximum at 7 d, and then decreased. It can be deduced that there was a positive correlation between enzyme activities in serum and the bacterial accumulation in scallop ($P<0.05$). Soluble factors in serum were more sensitive to bacterial accumulation than those in haemocytes, therefore, the serum may be a chief part of innate immune system of bivalves to digest and kill invading bacteria. Bivalves have an open circulatory and innate immune system. Haemocytes and soluble factors operate in a coordinated way to provide protection from invading microorganisms, and different types of haemocytes play various roles in innate immunity. Understanding the immune response in bivalves to invasive infections at cellular and molecular levels offers a theoretical base for exploring molluscan probiotics. Further study on variations in activities and gene expression in haemocytes and the roles of different scallop tissues in immune system is required. [Journal of Fishery Sciences of China, 2011, 18(1): 89–95]

Key words: *Enterococcus faecalis*; *Pactinopecten yessoensis*; accumulation; distribution; superoxide dismutase; acid phosphatase

Corresponding author: FANG Jianguang, E-mail: fangjg@ysfri.ac.cn

2010 年《中国水产科学》年度引证报告

根据 2010 年《中国科技期刊引证报告》(核心版)的统计数据,《中国水产科学》在 2009 年的总被引频次为 1 698,在水产学类科技期刊中排名第二;影响因子为 1.243,在水产学类科技期刊排名第 1 位;综合评价总分 96.9,在水产学类科技期刊中排名第 1 位,在 1 946 种中文核心科技期刊中排名第 3 位。其他各项指标均取得优异成绩。并再次获得“中国百种杰出学术期刊”的荣誉。这些成绩及荣誉的获得是各位作者、审稿专家及广大读者辛勤努力和鼎力支持的结果,在此谨向为本刊发展做出支持与贡献的各位同仁表示衷心的感谢!

《中国水产科学》编辑部

2010 年 11 月 28 日